

# MIKROBIOMNOVINY

## Informační servis

České mikrobiomové společnosti ČLS JEP, z.s.

### Motto měsíce:

RASISMUS JE NESMYSL

Každá lidská rasa, každé etnikum či orientace jsou nám blíží než kterákoli z milionů našich vlastních střevních bakterií.

### Upozornění na akce:

Úspěšný cyklus seminářů pro veřejnost v Městské knihovně bude pokračovat i příští rok. Abychom vyšli vstříc většímu počtu návštěvníků, posunuli jsme začátek na 18:30 hod.

#### 1.2. 18.30 Městská knihovna

„Mikrobiom a onkologická onemocnění“

Prof. Petra Tesařová

#### 1.3. 18.30 Městská knihovna

„Mikrobiom a slizniční imunita“

Prof. Helena Tlaskalová Hogenová



### Editorial

Milí přátelé,

připadnul mi nelehký úkol – napsat Editorial k vánočnímu číslu našich novin. Bilancování letošního roku by snadno mohlo sklouznout k myšlenkám neveselým až depresivním, ale řekněte sami: KOMU BY TO PROSPĚLO? V našem redakčním týmu jsme už dávno dospěli ke shodě, že tento svět potřebuje nejvíc ze všeho šířit pozitivno. A snažíme se to dělat i mimo rámec Mikrobio(m)novin – Míša svým laskavým divadlem a krásnými obrázky, Jirka hudbou (a taky zachraňováním životů), Petra aktuálně neúnavnou péčí o všechno menší než metr ale hlavně nadstandardní péčí o své studenty, Jakub vzdělávacími podcasty Medici Boni ([zkuste!](#)), Monika zachraňuje planetu a neúnavně bojuje za práva všech znevýhodněných. A pro toto číslo novin jsem Vám vybrala i stejně pozitivně naladěnou autorku hlavního článku/rozhovoru. Mgr. Klára Doubková (kromě toho, že létá na křídle, hraje na kytaru v kapele a maluje) pracuje jako forenzní genetik Policie České republiky, specializující se na identifikaci stop. Lidská DNA se v kriminalistice využívá již dlouho, ale jak je to s mikrobiomem? Články na téma využití mikrobiomu ve forenzní analýze se objevují už několik let, ale co na to říká praxe? Kláru jsme vyzpovídali „co se do novin vešlo“, pokud ale na některé své otázky odpovědi nenajdete, neváhejte a napište nám na naši novou adresu cms@mikrobiom-cms.cz – dotaz rádi předáme a zodpovíme příště.

## Upozornění na akce:

**23.2. 2023**

Lékařský dům v Praze

### „Antibiotika a probiotika - ano či ne?“

Odborný seminář

a panelová diskuse.

Program se ještě ladí,

pozvánky dostanete

e-mailem a včas je umístíme

i na naše stránky do sekce

Aktuality [ZDE](#)

**4.4. 2023 v Praze**

Naše spřátelená **Společnost pro probiotika a prebiotika** pořádá své **17. Sympózium**

Link [ZDE](#)

## Mezinárodní akce:

Velký výběr mezinárodních konferencí

s mikrobiomovou tematikou

naleznete [ZDE](#)

Pro ty, kterým nestačí metodické Petřino okénko, bude skvělým zdrojem poučení

**ICMA: 17. International Conference on Microbiome Analysis 27.-28.3. 2023 v Sydney, Austrálie**

Link [ZDE](#)

**30.6. - 2.7. Bělehrad, Srbsko**

FEMS - konference federace

V pravidelných rubrikách Vás tradičně zveme na spoustu zajímavých akcí, Petra si zase ve svém metodickém okénku postěžuje, jak „to nejde“, Jakub pro Vás našel, jak spolu interagují mikroby po transplantaci stolice a s Jirkou si určitě dáme něco mikrobio na zub.

Do nového roku Vám všem přejeme co nejvíc obyčejných malých lidských radostí a sem tam nějaké příjemné překvapení. Těšíme se na setkání s Vámi naživo na našich akcích (poznáte nás podle krásných triček). A nezapomeňte se občas mrknout na naše webové stránky – naše kolegyně Mgr. Petra Nováková jim dává nový kabát (MOC děkujeme) a tak tam aktuality, stanoviska, záznamy přednášek i upozornění na akce naleznete čím dál snadněji!

## Téma měsíce: Mikrobiom ve forenzní analýze:

V odborné literatuře se stále častěji objevují články, ukazující na možnost využití mikrobiomu (nejčastěji kožního nebo orálního) ve forenzní analýze. Pro zájemce např. tato recentní práce ([Díez Lopéz et al 2022](#)). Velká věc! ALE – co si pod tím představit doopravdy? Co může ukázat analýza mikrobiomu NAVÍC oproti stávajícím metodám? Jsme už tak daleko, aby se analýza mikrobiomu skutečně dala použít k dopadení a usvědčení pachatele? Jaké jsou výhody a na co si musíme dát pozor?

Ptáme se Mgr. Kláry Doubkové, forenzní genetičky PČR

### Co si představit pod pojmem forenzní genetiky?



Zjednodušeně řečeno se jedná o obor, ve kterém se pro potřeby vyšetřování trestných činů a trestního řízení využívají metody molekulární biologie. Aktuálně se v ČR forenzní genetiky v drtivě většině případů zaměřuje na analýzu lidské DNA obsažené ve stopách zanechaných na místě činu s cílem identifikace osoby, která biologickou stopu zanechala, případně na identifikaci mrtvol neznámé totožnosti pomocí určení příbuzenských vztahů. Ve světě se již běžně v rámci forenzní genetiky analyzuje DNA zvířat i rostlin, např. DNA psů a koček, ohrožených druhů zvířat apod., z rostlin třeba konopí.

U nás se zkoumání nehumánní DNA zaměřuje právě na analýzu konopí z pěstíren a na určení druhů zvířat (např. při analýze plagiátu tygří masti, která kosti tygra našťestí neobsahovala, nebo v případech napadení člověka psem). V ČR se forenzní genetické zkoumání díky právnímu rámci soustřeďuje prakticky výhradně do laboratoří PČR, ve kterých je historicky kladen důraz na individuální identifikaci osob. Nicméně forenzní genetika je oproti jiným forenzním disciplínám velmi mladý a dynamický obor, který se neustále vyvíjí a má opravdu široký záběr a jsem si jistá, že se bude neustále posouvat k širšímu spektru zkoumaných oblastí. To, kam se posune, bude z velké míry také dáno legislativním rámcem jednotlivých zemí. To, co je např. v USA již běžně používáno, se v Evropě jen zatím obtížně prosazuje a naopak. Příkladem takové disciplíny může být např. forenzní genetická genealogie, která testuje vzdálené příbuzenské vztahy a která v USA vedla k objasnění již nemalého počtu trestných činů, avšak v Evropě si na její běžné využití ve forenzní praxi ještě budeme muset počkat. Není to dáno tím, že by Evropské laboratoře nebyly schopny analýzu provést, nebo že by neměly přístup do obsáhlých genealogických databází se sekvenačními daty, ale spíše tím, že legislativní podmínky jednotlivých států se značně liší a definovat společný právní rámec umožňující využití této analýzy na Evropském kontinentu není vůbec jednoduché. Obdobně tomu bude zřejmě i v oblasti analýzy mikrobiomu, o kterém se začalo vážněji uvažovat v souvislosti s forenzním využitím až díky možnostem sekvenování nových generací (NGS) a který NEBUDE možné efektivně využít bez sdílení dat a databází, o právním rámci nemluvě.

### **Mohou se tedy dnešní kriminalisté opřít i o analýzu mikrobiomu, jak naznačují některé publikace?**

I když jsem velkým fanouškem mikrobiomu, tak u nás ještě bohužel ne, stejně tak ve světě je tento typ analýzy zatím spíše pouze testován, využití v ostrém případě jsem nenašla, to ale neznamená, že již nebyl použit. Jako každý nový přístup i analýza mikrobiomu skýtá četná úskalí a nespočet otázek k zodpovězení, zejména ohledně zajištění vzorku, srovnávacích vzorků, jejich uchování a zpracování (např. problematika tzv. „kitomu“ – DNA kontaminace z izolačních kitů a laboratorního spotřebního materiálu – o tom více v některém z metodických okének Petry Vídeňské). Velkým tématem je i interpretace výsledků a jejich začlenění do forenzní praxe tak, aby výsledek byl akceptován a správně uchopen všemi příjemci informace. Tento typ analýz nebude poskytovat odpovědi typu ANO/NE, ale bude mnohem více pracovat s mírou pravděpodobnosti, a to si musí uvědomovat jak forenzní genetik, který informaci poskytuje, tak i vyšetřovatel nebo státní zástupce, který na jejím podkladě jedná. Oproti stávajícím molekulárně genetickým metodám je analýza mikrobiomu mnohem komplikovanější nejen laboratorně, ale i na úrovni vyhodnocení a interpretace. Bude tedy na zvážení, kde tato analýza bude mít opravdu smysl a kde by jen konkurovala již dostupným zavedeným postupům. Nicméně nemalé množství publikací zabývajících se již konkrétními možnostmi využití pro forenzní účely svědčí o tom, že se s analýzou mikrobiomu do budoucna určitě počítá, a to jak s analýzou lidského mikrobiomu, tak i mikrobiomu environmentálního (např. vzorky půdy, vzorky vody v plicích oběti apod.). Budoucnost vidím zejména v rozvoji bioinformatických a biostatistických metod (hlavně neuronových sítí), které ulehčí práci s velkým množstvím vstupních dat a s následnou interpretací.

Stávající forenzní genetická analýza poskytuje dva základní typy informací – první typ informací se týká identifikace osoby, která zanechala biologický materiál ve stopě, tato metoda je již velmi dobře zavedená, je relativně jednoduchá na provedení i interpretaci a její citlivost se pohybuje v řádech několika málo desítek pg a je zatím bezkonkurenční. Druhý typ zahrnuje mnohem širší a variabilnější oblast operativních informací – tedy informací, které napomáhají zúžit okruh možných pachatelů. A právě na tomto poli já osobně vidím největší potenciál analýzy lidského mikrobiomu, který ze své biologické podstaty poskytuje informace i jiného typu než analýza lidské DNA.

## Co si pod tím můžeme představit?

Zatímco lidská DNA je až na výjimky relativně konzistentní v čase (ve smyslu života jedince) a identická ve všech typech tkání (STR profil DNA je stejný z bučálního stěru, krve, slin, spermatu, epitelíí aj.), lidský mikrobiom kromě svého specifického a individuálního složení daného genetickými predispozicemi a imunitním systémem jedince také odráží jeho aktuální „biologický“ stav. Analýza mikrobiomu by tak kromě možnosti identifikace jedince mohla poskytnout informace týkající se způsobu života osoby, která zanechala svoji biologickou stopu na místě činu, o jejím geografickém původu (ne z hlediska dávných předků, ale to, kde pravděpodobně žije v současnosti), o jejím zdravotním stavu, ale i třeba o fyzickém kontaktu osob apod., druhu biologického materiálu. Stejně tak enviromentální mikrobiom je dynamický a jeho analýza by mohla poskytnout informace týkající se příčiny úmrtí (utonutí apod.), post mortem intervalu, mohla by indikovat přítomnost rozkládajícího se lidského těla např. v prázdném kufu auta, efektivně srovnávat vzorky půdy tam, kde není výsledek geologického zkoumání dostatečně průkazný (vzorek půdy v drážce podrážky boty podezřelé osoby a vzorek půdy na místě činu). Ukazuje se, že má dokonce potenciál odhadnout časový rámec vzniku stopy, což je naprosto zásadní informace, kterou stávající analýza DNA není schopná poskytnout. Hranice mezi lidským a enviromentálním mikrobiomem je dle mého způsobu uvažování velmi tenká, stejně tak jako hranice mezi lidskou DNA a lidským mikrobiomem a nejlepších odpovědí se dobereme jedině komplexním přístupem. V ideálním případě tedy jednou v budoucnu budeme na místě činu zajišťovat komplexní stopy, tj. stopy, u kterých budeme zároveň analyzovat co nejvíce jejich součástí včetně lidské DNA a lidského i enviromentálního mikrobiomu.

I přes to, že vnímám obrovský potenciál světa mikrobiomu a nepřehledné množství možných analýz, jeho zavedení do rutinní forenzní praxe bude ještě běh na dlouhou trať a jeho využití, zejména v počátcích, vidím spíše v operativě a jen v takových případech, kdy je naprostý nedostatek jakýchkoliv jiných důkazů a informací. Uvedu příklad z praxe, např. v případech sériové trestné činnosti, kdy jsou na místech činu opakovaně nacházeny biologické stopy jedné a té samé neztotožněné osoby a lze tedy předpokládat, že se skutečně jedná o biologický materiál pachatele a vyšetřováním se nedaří dopátrat, kdo by tou osobou mohl být. Zde by jakákoliv informace vymezující užší okruh osob byla velmi užitečná a u takovýchto případů bude skvělé mít možnost sáhnout po nějaké další metodě. Nejsem ale zastáncem toho, aby se za každou cenu nahrazovaly již fungující metody. Když budete chtít určit druh stromu před vaším domem, také ho nebudete hned sekvenovat, ale podíváte se na jeho listy, kůru apod.

## Používá se analýza mikrobiomu v této souvislosti již někde v zahraničí?

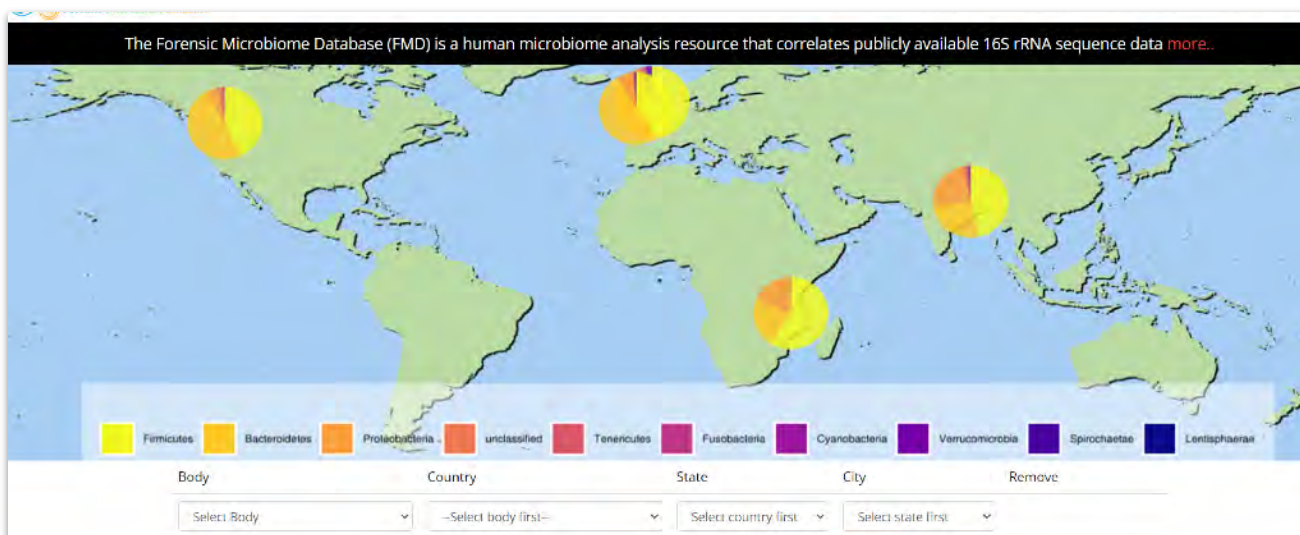
Není mi známo, že by se již někde v zahraničí analýza mikrobiomu použila v ostrém případě, a rozhodně není nikde zavedena rutinně jako běžná součást forenzních analýz. Stejně tak jako je tomu v případě lékařské genetiky a forenzní genetiky se domnívám, že i na poli analýzy mikrobiomu bude forenzní použití v závěsu za lékařskými poznatky z této oblasti a velká část mnou výše uvedených možných informací bude interpretovatelná až v momentě, kdy bude k dispozici dostatečně velké množství dat včetně relevantních metadat, tedy skutečně kvalitního popisu vzorků. Zároveň bych ráda upozornila na jednu drobnost, která není na první pohled zřejmá. Zatímco lékařská genetika, potažmo medicína pracuje se vzorky známého původu ve smyslu povahy vzorku i identity osoby, které je vzorek odebrán, forenzní disciplíny zkoumající biologický materiál pracují se vzorky neznámého původu a se vzorky velmi často degradovanými či jinak poškozenými, a to samozřejmě s sebou přináší potřebu trochu jiného přístupu k celkovému postupu a hlavně interpretaci výsledku.





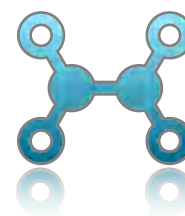
## Zmínila jsi možnost určení geografického původu osoby, jak by to mohlo fungovat?

Nedávno vyšel zajímavý článek ([Cho et al, 2021](#)), který představuje veřejnou [forenzní mikrobiomovou](#) databázi. Tato databáze soustřeďuje data o složení mikrobiomu z různých nik asociovaných s lidským tělem (kůže, sliny, vaginální tekutina, stolice) pocházejících z 35 zemí. I když se jedná zatím spíše o pilotní projekt (viz výhrady níže), už v této fázi se ukazuje složení mikrobiomu se liší nejen v závislosti na tělní nuce, ale i na geografii. Např. v kožních vzorcích je poměr zástupců rodu *Staphylococcus* a *Corynebacterium* vyšší u vzorků pocházejících z Asie než z Ameriky. Ve vaginálních vzorcích je univerzálně rozšířen rod *Lactobacillus*, ale kromě toho v něm lze nalézt i endemické zástupce, např. *Serratia* se vyskytovala ve vzorcích odebraných v Brazílii, výskyt *Enterobacter* byl vázán na Kongo. Už tyto první výstupy dávají tušit, že pokud bude databáze dobře spravovaná, tedy bude obsahovat důvěryhodná data a dobře zpracovaná dostupná metadata, a nasbírá dostatečné množství vzorků, stane se určitě skvělým pomocníkem. Aktuální počet vzorků je však jen v nižších desítkách tisíc, chybí link na zdroje sekvenčních dat (jsou to veřejně dostupná data 16S sekvenací všech typů bez bližší specifikace), možnosti komparace stávajících vzorků z různých zdrojů jsou minimální, chybí možnost stažení dat pro vlastní analýzu. Je to tedy zajímavý počín, ale zatím pouze teoreticky.



## Jak je to s jednovaječnými dvojčaty a mikrobiomem?

U lidské DNA je odpověď na tuto otázku jednoduchá, jadernou DNA mají jednovaječná dvojčata shodnou, u mikrobiomu, který je mnohem více komplexní, a navíc dynamický, je odpověď složitější, ale ze své biologické podstaty dva různí jedinci nemohou mít zcela shodný mikrobiom. Některé z publikací uvádí, že u střevního mikrobiomu, který tvoří hlavní část celkového lidského mikrobiomu, je pouze kolem 50% jeho složení determinováno geneticky. Část je definována imunitním systémem jedince a zbytek se odvíjí od mnoha vnějších i vnitřních faktorů. Dá se předpokládat, že jednovaječná dvojčata žijící ve stejné domácnosti budou mít velkou část mikrobiomu shodnou, ale určitě ne kompletní mikrobiom. Nic z tohoto však zatím není dostatečně prozkoumáno, takže jsou to pouze mé domněnky, na základě několika publikací nemohu vynášet nějaká zásadní sdělení. Právě tato dynamičnost mikrobiomu odrážející celkový stav jedince bude, až ji jednou budeme schopni dostatečně věrohodně popsat a pochopit, velkým zdrojem informací nejen pro medicínu, ale i forenzní genetiku. Aktuálně však představuje tato budoucí výhoda velkou výzvu a je i důvodem, proč je část odborné veřejnosti k analýze mikrobiomu velmi skeptická, a to i s ohledem na možné forenzní použití.



## Novinky

### Vzájemné působení mikrobů po transplantaci stolice

Transplantace fekální mikrobioty (FMT) je účinnou léčbou těžkého průběhu klostridiové kolitidy (CDI), život ohrožující střevní infekce vznikající v důsledku nadužívání určitých skupin antibiotik. Ač velmi účinná, přesný způsob jejího působení zůstává nejasný. Tým [Peera Borka](#) ve své nové studii popisuje, že mikrobiota příjemce, a nikoli dárce, má hlavní podíl na složení definitivní mikrobiální směsi, která vzniká po splynutí mikrobioty dárce a příjemce.

Zjištění Borkova týmu publikovaná v *Nature Medicine* mohou být podkladem pro vývoj účinnějších terapeutických možností a mohly by i pomoci identifikovat příjemce, kteří by z FMT měli největší prospěch. "Jak se bude zlepšovat naše chápání ekologických procesů ve střevě po FMT, můžeme objevit přesnější a cílenější vazby na klinické účinky – například pak možná dokážeme vytěsnit pouze specifické kmeny (např. patogeny) a zároveň minimalizovat „vedlejší“ účinky na zbytek mikrobioty," říká vedoucí autor studie Peer Bork z Evropské laboratoře molekulární biologie v Heidelbergu.

Myšlenka FMT spočívá v tom, že střevní mikroorganismy dárce mohou pomoci upravit mikrobiotu příjemce způsobem, který podporuje zdraví střeva. O vzájemném působení mikrobioty dárce a příjemce po transplantaci však zatím mnoho nevíme. Bork a jeho kolegové ve snaze rozklíčovat tuto problematiku analyzovali klinická a metagenomická data z 316 FMT použitých k léčbě deseti různých onemocnění. Analyzovali vzorky před a po FMT a kvantifikovali dynamiku více než 1 089 bakteriálních druhů. Předchozí práce Borkova týmu ukázala, že kmeny dárce a příjemce mohou koexistovat. Tentokrát vědci zjistili, že **mikrobiální směs, která je výsledkem FMT, určuje spíše mikrobiota příjemce než dárce.**

Některé rody, včetně *Bacteroides*, *Blautia* a *Faecalibacterium*, byly často nalezeny v koexistenci, zatímco např. *Veillonella parvula*, *Akkermansia muciniphila* a *Prevotella copri*, se neuchytily, a u příjemců se vyskytovaly méně často. Dále tým hodnotil, které faktory určují úspěšnost kolonizace střeva příjemce mikrobiotou dárce. Zjistili, že diverzita střevní mikrobioty příjemce a také to, jak moc se jeho mikrobiota liší od mikrobioty dárce, jsou hlavními faktory, určujícími kterým druhům se bude po transplantaci dařit. V mikrobiotě příjemce patřily bakterie řádu Bacteroidales k nejsilnějším inhibitorům kolonizace, zatímco *Lactococcus lactis*, *Streptococcus salivarius* a *Dialister invisus* u příjemce kolonizaci podporovaly. Vědci však poznamenávají, že kolonizace střeva jednotlivými druhy byla předvídatelná pouze částečně. "To naznačuje, že úspěšnost kolonizace může být do značné míry stochastická," uvádějí.



## Slovníkové podokénko

Všechny níže popsané definice jsou psány bez googlu přímo z mojí hlavy, neb věřím, že google ovládáte stejně dobře jako já a já nechci dělat práci za vás, čímž to se ale nemusí plně shodovat s oficiální definicí, a tedy se v tomto okénku vzděláváte na vlastní nebezpečí.

Primer - krátký uměle nasyntetizovaný **oligonukleotid**, který ohraničuje sekvenci DNA, kterou chceme amplifikovat pomocí PCR a bez kterého by tato amplifikace nebyla možná

Oligonukleotid - krátká sekvence nasyntetizovaných **bází**

Báze, nukleotid - DNA se skládá za základních bází, ATCG, které svými kombinacemi tvoří genetický kód.

Amplifikace - zmnožení, v našem případě dané sekvence ohraničené primery pomocí **polymeráz**.

Polymeráza - enzym, díky kterému dochází k replikaci DNA nejenom v PCR, ale i v buňkách.



## Metodické okénko aneb proč o střevním mikrobiomu stále h...o, pardon, STOLICI víme

Tak, od minulého příspěvku máme vyizolovanou DNA, huraaaa 😊 To je naprosto zásadní milník v naší pouti za analýzou mikrobiomu. Pokud ve své laboratoři hýčkáte zkumavku plnou bezbarvé tekutiny, o které víte, že obsahuje dostatečné množství kvalitní bakteriální DNA bez inhibitorů, tak byste minimálně měli bouchat šampaňské a tancovat na laboratorních stolech ve sterilních návlecích. To nejtěžší máte za sebou a teď už vás čekají jen světlé zítřky zalité sluncem a plujícími duhovými jednorožci.

Samozřejmě kecám. Čeká vás opět jen pot, dřina a frustrace a spousta rozhodnutí, jak se dostat ke kýženým výsledkům s co nejmenším počtem odchylek od neznámé reality. První rozhodnutí se bude týkat toho, zda se vydáte cestou sekvenace genu pro 16S rRNA nebo celometagenomového sekvenování (WMGS, whole metagenome sequencing, shot gun metagenomic). Nebo obojího. Dnes nás tedy čeká porovnání obou technik a shrnutí jejich výhod a nevýhod. Ale nebojte se, ono stejně víc než na vašem vědeckém názoru bude záležet na tom, co unese vaše laboratorní peněženka. Všichni chceme jezdit v mustangu, ale vystačíme si se škodovkou (teda já ne, já zásadně na koloběžce ale srovnání mého MIBA s koloběžkou z Hervisu by prostě pochopili jen ti nejlepší z vás).

Základní rozdíl mezi těmito dvěma přístupy spočívá v tom, že u sekvenace genu pro 16S rRNA sekvenujeme pomnožený kratoučký úsek DNA, který má v sobě každá bakterie, a u celometagenomového sekvenování prachprostě osekvenujete veškerou DNA ve vzorku - tedy většinou, jsou i výjimky kdy se vzorkem můžete různě čarovat, ale to jindy.

Sekvenace genu pro 16S rRNA patří do skupiny tzv. cíleného sekvenování, kdy před samotnou sekvenací **amplifikujeme** krátký úsek DNA pomocí **PCR**. Gen pro 16S rRNA má slavnou historii, kdy jej využil roku 1977 Carl Woese ke zjištění fylogenetických vztahů mezi bakteriemi a objevil novou doménu života na zemi - Archea (Schválně, kolik z vás o nich v životě neslyšelo. A to ty domény známe jen tři...). Je to velmi důležitý gen, protože zajišťuje spojení ribozomálních podjednotek, které jsou zase potřebné pro translaci RNA do proteinů. A právě proto, že je tak hrozně moc důležitý, mají ho všechny bakterie relativně konzervovaný, ale ne úplně a tak má tento gen dvě superschopnosti. Jednak obsahuje konzervativní oblasti, kam lze cílit primery a kromě toho i devět variabilních oblastí, které nám umožňují rozlišovat bakterie mezi sebou.

Problém dnešní technologie je, že tento gen má přes patnáct set bází (bakterie se mírně délkou liší), ale my nejčastěji sekvenujeme max. 450 bp dlouhý úsek. Takže si musíme vybrat, kterou z těch oblastí



**PCR** - polymerázová řetězová reakce, alias, když smícháte DNA, jejíž malý kousek chcete pomnožit, primery, volné nukleotidy jako stavební prvky a polymerázu, jako fachmana, který to vše oddře, tak vám vzniknou miliony kopií vámi touženého produktu.

Tedy samozřejmě pokud neuděláte někde nějakou chybu, třeba při návrhu **primerů**, dáte všeho správné koncentrace, zvolíte správné teploty, které má náš fachman rád a zrovna neprobíhají skvrny na slunci.

Translace RNA - věc se má tak, že DNA je jen něco jako archiv, je tam všechno, je tam toho moc a málokdo se v tom vyzná. Proto když chce buňka něco udělat, prvně přepíše (transkribuje) jen malý úsek (gen) DNA do RNA. RNA, to už je použitelný datový soubor, podle kterého lze něco vyrobit. A to něco je bílkovina, základní stavební jednotka našeho těla a my jsme tuto výrobu nazvali translací.

bp - base pair, prostě si představte, že 1 bp je jedna báze/nukleotid, 100 bp je sekvence o délce 100 nukleotidů...

**In silico** - prostě si sekvence prvně pomocí nějakého programu srovnáte na počítači



prosekvenujeme a tím se dostáváme k výběru vhodných **primerů**. A zde se můžete zasekat do konce života. Můžete se hádat po celém světě s jakýmkoliv vědcem zkoumajícím záhady mikrobiomu. A každý bude mít svůj samozřejmě jedině správný názor. Každopádně je fakt, že dokonalý primer neexistuje. Konzervativní oblasti nejsou až tak moc konzervativní, aby je všechny podchytil jeden jediný primer. Takže nikdy žádným primerem nezachytíte všechny bakterie ve vzorku. Pomocí databáze **RDP** se můžete podívat, co který primer teoreticky chytá a co ne (takže můžete předejít překvapení, že ve vzorku nenacházíte přesně tu skupinu bakterií, o které víte, že tam na tudy musí být).

Zároveň ale ani variabilní oblasti nejsou tak variabilní, abyste dokázali bakterie od sebe bezpečně rozeznat na úrovni druhu. Zde u různých druhů bakterií může být výhodnější ta či ona variabilní oblast, obecně čím delší úsek sekvenujete, tím lepší rozlišení, ale zázraky nečekejte. Sem tam něco rozeznáte jen do kmene, velice často do čeledě, méně často do rodu a o druhu si nechejte zdát (pokud vidíte výsledky sekvenace ve velkém určené do druhu, je to tím, že se přiřazuje nejbližší příbuzná sekvence s nomenklaturou, což ale nemusí odpovídat realitě). Opět, pokud si chcete být jisti, že dokážete pomocí této sekvenace rozlišit některé své oblíbené bakterie, nezbyvá vám než si prvně udělat *in silico* analýzu. V oblasti lidského mikrobiomu, ve které se nejlépe orientují, pozorují již delší dobu příklon zejména ke dvěma párům primerů – jedny pochází z [Earth microbiome project](#) a druhé doporučuje [protokol pro sekvenaci genu pro 16S rRNA přímo od Illuminy](#). Oba mají své chyby a těžko je můžeme označit za ideální, takže nic vám nestojí v cestě za hledáním svatého grálu ve formě dokonalých primerů, ale vzhledem k tomu, že tyto dva primery používá značná část světa, chybu s nimi také neuděláte.

Další slabinou sekvenace genu pro 16S rRNA je to, že každá bakterie má tento gen ve svém genomu několikrát. A protože já vím, že už začínáte ty malé, zlé, zákeřné a vaši duši zaživa hlodající potvory znát, tak správně tušíte, že každá bakterie má počet kopií tohoto genu jiný. A pod vaší semikvantitativní analýzou se právě otráslý základy. Co s tím? Můžete do analýzy zahrnout krok s normalizací na počet známých kopií, ale já to třeba dělám nerada (a za to mě určití odborníci minimálně nechají za trest klečct v koutě na hrachu), protože ten počet kopií známe jen u známých bakterií, které ale v našem vzorku často tvoří jen malou část. Zbytek je nutno odhadnut a je otázka, zda je lepší tam mít nějakou vždy stejnou standardní chybu, nebo to normalizovat a zavádět si chybu novou, závislou na databázi a momentálním stavu znalostí. Už víte, co jsem myslela tím potem, dřinou a frustrací, což? A to není všem metodickým okénkům konec.

Ale abychom se nebavili jenom o tom, co je špatně, povězte si také velkou výhodu tohoto přístupu. Je to právě **amplifikace**. Díky ní lze osekvenovat i vzorky s relativně nízkým zastoupením bakteriální DNA, které se pomocí celometagenomového přístupu sekvenují velice špatně a pro nutnou vysokou prosekvenovanost (většinu vyhodíme ve formě nepotřebné lidské nebo jiné hostitelské DNA) jsou doslova a do písmene k nezaplacení.



Možná se ptáte: „To sakra ta bakterie nemá nějaký lepší gen, který lze analyzovat?“ V průběhu minulých let jsem zaznamenala takové pokusy, ale žádný jiný gen nebude mít to, co má jen a jen gen pro 16S rRNA – bohaté databáze. A v metagenomice vše stojí i padá na kvalitě databází. Takže vás musím zklamat, jednodušší cesta se jen tak nenajde. V některém příštím okénku se vydáme za možnosti sekvenace celého genu pro 16S rRNA, ale vzhledem k tomu, že hlavní výhoda celého tohoto postupu je jeho (relativně) nízká cena, tak se masivně obzvláště ve velkých studiích využívá právě tato metodika.

### Celometagenomová sekvenace

Ač je to výrazně dražší analýza mikrobiomu, její cesta laboratoří je mnohem přímočařejší. Jednoduše si připravíte knihovnu z veškeré DNA, kterou ve vzorku máte a tu dáte sekvenovat. A že toho sekvenujete hodně. Pomocí markerových genů můžete bakterie určit nejenom do druhu, ale někdy i do kmene. Můžete se dívat na přítomné metabolické dráhy. Můžete studovat geny rezistence. Nebo vyhledávat zajímavé geny pro enzymy, které se pak uplatní v některém biotechnologickém odvětví. Můžete sestavovat nové geny i genomy. Můžete studovat mykobiom. I nějaký ten DNA virus můžete prozkoumat. Ale znáte to, každá sranda něco stojí a tak se tento přístup zatím stále využívá spíše pro menší projekty, kde je ale nezbytné jít do hloubky a vzorky dobře popsat nejenom z taxonomického hlediska.

#### **Analýza genu pro 16S rRNA**

##### **Výhody**

- Cena – sekvenuje se pouze malá část vzorku
- Lze sekvenovat i vzorky s minimálním množstvím bakteriální DNA (ale problém jsou kontaminace a chyby při amplifikaci)
- Relativně dobře zavedená metodika a bioinformatická analýza dat

##### **Nevýhody**

- Žádný primer nezachycuje všechny bakterie
- Krátký úsek variabilní oblasti nezajišťuje dobré rozlišení ani na úrovni rodu (rozlišitelnost se liší u různých bakterií)
- Bakterie mají různý počet kopií genu pro 16S rRNA, proto se musí semikvantitativní výsledky analýz brát s určitým nadhledem
- Analýzou se zachytávají pouze bakterie, někdy mohou primery nasedat i na Archea

#### **WMGS**

##### **Výhody**

- Získáme informace nejenom o bakteriálním složení ve vzorku, ale i o ostatních genech, např. lze najít nejobundantnější geny metabolických drah, geny pro antibiotickou rezistenci, geny pro různé enzymy zájmu apod.
- Pomocí vybraných markerových genů lze některé bakterie určit až do druhu
- Lze zároveň identifikovat i další mikroorganismy (DNA viry, plísňe..)

##### **Nevýhody**

- Cena cca 10-30x vyšší, než u analýzy genu pro 16S rRNA
- U vzorků s malým množstvím bakteriální DNA problém s tvorbou knihovny, u některých vzorků téměř nemožné
- Není shoda v bioinformatické analýze dat
- Nemusí být dostatečně hluboké, aby detekovalo vzácné druhy

A protože v našem okénku držíme prsty na tepu doby, na závěr si něco povíme o novince – tzv. [Shallow Shotgun Metagenome Sequencing](#) či [Shallow Whole metagenomic Sequencing](#) (SSMS či S-WMS, já bych si to dovolila přeložit jako mělké shot gun metagenomové či celometagenomové sekvenování). V principu jde o to, že uděláte vše stejně jako při přípravě klasické celometagenomové knihovny, ale neprosekvenováváte tak hluboko. Tím se výrazně sníží cena, pořád trochu dražší než sekvenování genu pro 16S rRNA, ale zase díky markerovým genům je lepší identifikace bakterií. Tato metoda ale nemůže nahradit analýzu genu pro 16S rRNA u vzorků s nízkým zastoupením bakteriální DNA ve vzorku nebo u vzorků, kde je většina neznámých bakterií a tím pádem u nich nejsou známy markerové geny a ani není vhodná, pokud využíváte WMGS pro například sestavování nových genů. Tato metoda se doporučuje užívat zejména u velkých kohortových studií při analýzách střevního mikrobiomu.

Tak už víte, kterou metodu si vyberete pro své analýzy? Pojedete sekvenování genu pro 16S rRNA a budete šetřit na celometagenomové sekvenování pro ty nejzajímavější vzorky nebo pooly vzorků?

At' je to jak je to, obě techniky mají určitou chybovost, která je ale významně vyšší u levnějšího a využívanějšího sekvenování genu pro 16S rRNA a je to tedy jeden z důvodů, proč o střevním mikrobiomu stále h...o, pardon, STOLICI víme.

## MikroBioKuchyně

Tentokrát bychom v naší mikrobiální kuchyni rádi upozornili na bakteriociny a bakteriofágy jakožto přirozené nástroje, které by mohly zabránit růstu řady patogenních mikrobů v potravinovém řetězci. Přehledně o této zajímavé problematice pojednává souhrnný článek od autorského teamu [Claudia Rendueles et al. 2022](#)

Jedním ze zdrojů bakteriocinů mohou být bakterie mléčného kvašení, typicky hojně např. v kysaném zelí (pozor, určitě raději čerstvé, než koupené konzervované, tam už těch živých bakterií moc nezbyde), jogurtech nebo kefiru. Pokud si zelí naložíte sami doma, připravíte tak excelentní zdroj bakterií mléčného kvašení a doplníte tradičně také vitamín C. Jak zelí správně naložit se dočtete třeba na [www.zkvaseno.cz](http://www.zkvaseno.cz).

A s čím nám mohou aktivní látky produkované bakteriemi mléčného kvašení pomoci? Dle sdělení týmu [Barbara Breza-Boruta et al. 2022](#) brání např. růstu *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus*.

Tak dobrou chuť a at' jste stále fit.



Toto číslo pro vás připravila redakční rada.

Hlavní téma zpracovala:  
Mgr. Klára Doubková

Redakční rada  
MikroBio(m)novin:

MUDr. Jiří Vejmelka  
Doc.RNDr. Monika Cahová  
Ph.D., Mgr. Lucie Najmanová  
Ph.D., MUDr. Jakub Hurych  
Mgr. Petra Vídeňská, Ph.D.

Grafické zpracování :

Mgr. Michaela Bartoňová  
[www.michaelabartonova.cz](http://www.michaelabartonova.cz)

Těšíme se na vaše reakce,  
podněty a zajímavé příspěvky,  
které můžete zasílat na adresu:

[cms@mikrobiom-cms.cz](mailto:cms@mikrobiom-cms.cz)